

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : A23L 1/09, C08L 3/00, A61K 9/20, 31/715, A23K 1/16</p>		A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/38537</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Juli 2000 (06.07.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09298</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 30. November 1999 (30.11.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 60 375.4 28. Dezember 1998 (28.12.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): AVENTIS RESEARCH &amp; TECHNOLOGIES GMBH &amp; CO. KG [DE/DE]; D-65926 Frankfurt am Main (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): BENGS, Holger [DE/DE]; Bindingstrasse 3, D-60598 Frankfurt (DE). BRUNNER, Anette [DE/DE]; Wallersbacher-Weg 10, D-91154 Roth (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, CZ, HR, HU, JP, NO, PL, US, ZA, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>	
<p>(54) Title: <b><math>\alpha</math>-AMYLASE-RESISTANT STARCH FOR PRODUCING FOODSTUFF AND MEDICAMENTS</b></p> <p>(54) Bezeichnung: <b><math>\alpha</math>-AMYLASE-RESISTENTE STÄRKE ZUR HERSTELLUNG VON NAHRUNGS- UND ARZNEIMITTELN</b></p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to foodstuff and animal feed which contain resistant starch on the basis of water-insoluble linear <math>\alpha</math>-1,4-D-glucans. The invention also relates to the utilisation of resistant starch on the basis of water-insoluble linear <math>\alpha</math>-1,4-D-glucans as medicaments.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung beschreibt Lebens- und Futtermittel, die resistente Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer <math>\alpha</math>-1,4-D-Glucane enthalten, sowie die Verwendung resistenter Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer <math>\alpha</math>-1,4-D-Glucane als Arzneimittel.</p>			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

$\alpha$ -Amylase-resistente Stärke zur Herstellung von Nahrungs- und Arzneimitteln

**Beschreibung**

5 Die Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die  $\alpha$ -1,4-D-Glucane und/oder eine resistente Stärke daraus enthalten, zur Herstellung von Nahrungsmitteln. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung resistenter Stärke als Arzneimittel.

10 Ernährungsstudien haben gezeigt, daß falsche und einseitige Ernährung Grund zahlreicher Erkrankungen, beispielsweise von Darmerkrankungen und insbesondere von Kolonkarzinomen sind. Epidemiologische Untersuchungen zeigen, daß bei einer fettreichen und ballaststoffarmen Ernährung ein erhöhtes Risiko für die Entstehung entzündlicher Darmerkrankungen und Kolonkrebs beim Menschen besteht. Ballaststoffreicher Nahrung schreibt man dagegen einen 15 protektiven Effekt gegen kolorektale Erkrankungen zu.

20 Die Herstellung von sog. "Functional Food", d.h. Lebensmitteln, die nicht nur der Ernährung dienen sondern auch die Gesundheit fördern sollen, hat daher in letzter Zeit zunehmend an Bedeutung gewonnen. Solche Lebensmittel sind mit Zusätzen mit gesundheitsfördernder Wirkung angereichert.

25 Einer der Zusätze, der für die Lebensmittelindustrie zunehmend Bedeutung erlangt hat, ist resistente Stärke (RS), d.h. Stärke, die durch  $\alpha$ -Amylasen nicht abgebaut wird. Resistente Stärke wird demnach im Dünndarm des gesunden Menschen nicht verdaut und gelangt somit in den Dickdarm. Resistente Stärken in Lebensmitteln stellen somit eine energiereduzierte, körpergebende Komponente im Sinne eines Ballaststoffs dar.

30 Mit der Aufnahme RS-haltiger Lebensmittel sind jedoch auch noch zwei weitere Funktionen verknüpft, nämlich die Substratbereitstellung für den Energiestoffwechsel der intestinalen Mikroflora und den der

Dickdarmepithelzellen. Resistente Stärke wird durch die intestinalen Mikroorganismen oxidativ zu kurzkettigen Fettsäuren wie Acetat, Propionat und Butyrat abgebaut. Diese kurzkettigen Fettsäuren wiederum dienen den Dickdarmepithelzellen, die insbesondere auf die lumineale Zufuhr von Butyrat angewiesen sind, zur Aufrechterhaltung ihrer Struktur und Funktion.

5 Hohe lumineale Butyratspiegel im Kolon können außerdem einen Schutzfaktor gegen kolorektale Erkrankungen darstellen. Während Butyrat nämlich in normalen Kolonozyten das Wachstum über eine Kette von Reaktionen steuert, die in 10 normalen Kolonepithelzellen die Proliferation erhöht, scheint es die neoplastische Entwicklung von Kolonozyten zu unterdrücken.

15 Resistente Stärken kommen in der Natur nur in geringer Menge vor und entstehen während der Rekristallisation (Retrogradation) verkleisterter Stärke. Dabei bilden sich mikrokristalline Filamente, die ein Netzwerk ausbilden, wodurch eine enzymatische Hydrolyse verhindert wird.

20 Resistente Stärken, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung in Lebensmitteln sind seit langem bekannt.

25 So beschreibt die US-A-3 729 380 die gezielte enzymatische Behandlung von Stärke, um den Gehalt an hochverzweigtem Amylopektin zu reduzieren und den Anteil an kurzkettigen Amylosestrukturen, die gewöhnlich eine stärkere Tendenz zur Retrogradation und damit zur Bildung resisternter Stärke als native Stärken besitzen, zu erhöhen.

30 Die EP-A-0 564 893 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von RS-Produkten, bei dem eine wässrige Suspension einer Stärke verkleistert und mit einem Enzym, das die  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Bindungen spaltet, entzweigt wird. Das entstandene Zwischenprodukt wird anschließend retrogradiert.

Die EP-A-0 688 872 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von RS-Produkten, bei dem eine wässrige Suspension einer partiell abgebauten, verkleisterten Stärke enzymatisch entzweigt und das Zwischenprodukt retrogradiert wird.

5 In der US-A-5 776 887 wird eine Lebensmittelzusammensetzung für Diabetiker mit unterschiedlichen Kohlenhydratfraktionen offenbart, die unterschiedlich schnell absorbiert werden. Die langsam absorbierte Fraktion besteht dabei aus einer Maisstärke, die auch einen Gehalt an resisterter Stärke aufweist. Die US-A-5 776 887 stellt sich die Aufgabe, Kohlenhydrate über einen längeren Zeitraum 10 gleichmäßig freizusetzen, um überhöhte Glucosespiegel zu vermeiden.

Es besteht jedoch weiterhin ein starker Bedarf an verbesserten Nahrungsmitteln und Präparaten, die durch Zufuhr gesundheitsfördernder Stoffe das Wohlbefinden des Konsumenten steigern, einer fehlerhaften Ernährung 15 vorbeugen können und Krankheiten, beispielsweise ernährungsbedingter Natur, heilen helfen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, Lebens- und Futtermittel (im folgenden kollektiv Nahrungsmittel genannt) einerseits sowie pharmazeutische 20 und veterinärmedizinische Mittel (im folgenden kollektiv Arzneimittel genannt) andererseits bereitzustellen, die den Erhalt der Gesundheit fördern, das Wohlbefinden stärken und zur Behandlung und/oder Vorbeugung von Erkrankungen, beispielsweise infolge von Mangelernährung, bei Mensch oder Tier eingesetzt werden können.

25 Diese Aufgabe wurde durch den Einsatz von wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen in Kombination mit Lebens- oder Futtermitteladditiven zur Herstellung der oben genannten Produkte gelöst. In diesem Sinne versteht sich die vorliegende Erfindung als Weiterentwicklung der älteren, nicht vorveröffentlichten 30 DE-A-198 30 618, die die Verwendung wasserunlöslicher  $\alpha$ -1,4-D-Glucane zur Herstellung resisterter Stärke beschreibt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind demnach Zusammensetzungen, insbesondere zur Nahrungsergänzung, die ein wasserunlösliches lineares  $\alpha$ -1,4-D-Glucan und/oder eine daraus erhältliche resistente Stärke und wenigstens ein weiteres Lebens- oder Futtermitteladditiv enthalten.

5

Gegenstand der Erfindung sind ferner Nahrungsmittel, die mit diesen Zusammensetzungen erhältlich sind.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung resistenter Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer  $\alpha$ -1,4-D-Glucane als Ersatzstoff und/oder Kalorienreduktionsmittel in Nahrungsmitteln.

15

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind schließlich die Verwendung resistenter Stärken auf Basis wasserunlöslicher linearer  $\alpha$ -1,4-D-Glucane als Arzneimittel und pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zusammensetzungen, die solche resistenten Stärken enthalten.

20

Es wurde überraschend gefunden, daß wasserunlösliche lineare  $\alpha$ -1,4-D-Glucane bei der Retrogradation in großer Menge hochresistente Stärke, insbesondere vom Typ RS-III, liefern (Englyst et al. (Classification and measurement of nutritionally important starch Fractions, European Journal of Clinical Nutrition, 46 (Suppl. 23) (1992) 33-50).

25

Dies macht diese resistenten Stärken als Ersatzstoff für Nahrungsmittelinhaltstoffe, insbesondere als Ballaststoffersatz und als Fettstoffersatz, und damit auch als Kalorienreduktionsmittel geeignet.

30

Es wurde ferner gefunden, daß die aus wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen erhältliche resistente Stärke beim Abbau im Dickdarm nicht nur zu einer großen Menge kurzkettiger Fettsäuren, sondern insbesondere auch zu einem hohen Anteil der besonders vorteilhaften Butyrate führt.

Es wurde ferner gefunden, daß die aus wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen erhältliche resistente Stärke in Kombination mit anderen Lebens- oder Futtermitteladditiven einen synergistischen oder symbiotischen Effekt zeigt, indem sich die Wirkungen der Komponenten gegenseitig verstärken.

5

Unter wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen werden im folgenden die nicht  $\alpha$ -Amylase-resistenten Formen dieser Glucane verstanden.

Unter wasserunlöslichen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen werden hierbei  $\alpha$ -1,4-D-Glucane verstanden, die nach der Definition des Deutschen Arzneimittelbuches (DAB, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Gori-Verlag GmbH, Frankfurt, 9. Auflage, 1987) entsprechend den Klassen 4-7 unter die Kategorien "wenig löslich", "schwer löslich", "sehr schwer löslich" und "praktisch unlöslich" fallen.

15 Die Wasserunlöslichkeit der erfindungsgemäß eingesetzten  $\alpha$ -1,4-D-Glucane ist zweckmäßig derart, daß wenigstens 98%, insbesondere wenigstens 99,5%, der eingesetzten Polysaccharide unter Normalbedingungen ( $T = 25^\circ\text{C} \pm 20\%$ ;  $p = 101325 \text{ Pascal} \pm 20\%$ ) in Wasser unlöslich sind (entsprechend mindestens den Klassen 4 und 5 nach DAB).

20

Vorteilhaft entspricht die Wasserunlöslichkeit der eingesetzten  $\alpha$ -1,4-D-Glucane den Klassen 6 oder 7 nach DAB.

Unter linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen werden  $\alpha$ -1,4-D-Glucane verstanden, deren 25 Verzweigungsgrad maximal 4% beträgt, d.h. deren Hauptkette maximal vier Seitenketten auf 100 Monosaccharideinheiten aufweist.

30 Zweckmäßig beträgt der Verzweigungsgrad der wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glukane in 6-Position nicht mehr als 0,5 %. In 2- oder 3-Position beträgt der Verzweigungsgrad nicht mehr als 1 % und insbesondere nicht mehr als 0,5 %.

Besonders bevorzugt sind wasserunlösliche lineare  $\alpha$ -1,4-D-Glucane, die keine Verzweigungen aufweisen bzw. deren Verzweigungsgrad so minimal ist, daß er mit herkömmlichen Methoden nicht mehr nachweisbar ist.

5 Die gewichtsgemittelten Molekulargewichte  $M_w$  (bestimmt mittels Gelpermeationschromatographie im Vergleich zu einer Eichung mit Pullulanstandard) der erfindungsgemäß verwendeten wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane können in einem weiten Bereich variieren. Zweckmäßig besitzen die als Ausgangsmaterial eingesetzten wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glukane ein Molekulargewicht  $M_w$  von  $0,75 \times 10^2$  bis  $10^7$  g/mol, bevorzugt von  $10^3$  bis  $10^6$  g/mol und besonders bevorzugt von  $10^3$  bis  $10^5$  g/mol. Ein ganz besonders vorteilhafter Bereich liegt zwischen  $2 \times 10^3$  g/mol und  $8 \times 10^3$  g/mol.

10 Besonders bevorzugt weisen die verwendeten wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane einen hohen Anteil an Polymeren mit einem Polymerisationsgrad zwischen 15 10 und 35 auf. Vorteilhaft weisen wenigstens 25%, bevorzugt wenigstens 30% und besonders bevorzugt wenigstens 35% der eingesetzten  $\alpha$ -1,4-D-Glucanmoleküle einen Polymerisationsgrad von 10 bis 35 auf.

15 20 Die Polydispersität  $M_w/M_n$  der verwendeten wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane kann innerhalb weiter Bereiche variieren. Bevorzugte Werte für die Polydispersität liegen im Bereich von 1,01 bis 50, insbesondere von 1,5 bis 15. Die Verwendung von Glucanen mit niedrigerer Polydispersität ist aber wegen der besseren Reproduzierbarkeit der erhaltenen Produkte bevorzugt.

25 30 Die verwendeten  $\alpha$ -1,4-D-Glukane können auch chemisch in an sich bekannter Weise modifiziert sein, solange die Modifikationen im Hinblick auf die herzustellenden Nahrungs- und Arzneimittel unbedenklich sind. So können die  $\alpha$ -1,4-D-Glukane durch Veretherung oder Veresterung in 2-, 3- oder 6-Position in dem Fachmann bekannter Weise chemisch modifiziert sein. (s.a. Functional Properties of Food Components, 2nd edition, Y. Pomeranz, Academic Press (1991); Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Belitz & Grosch, Springer Verlag

(1992); Citrat Starch Possible Application as Resistant Starch in Different Food Systems, B. Wepner et al., European Air Concerted Action, Abstract: air3ct94-2203, Functional Properties of Non-digestible Carbohydrates, Pro Fibre-Tagung, Lissabon, Februar 1998, Seite 59). Bevorzugt werden jedoch chemisch unmodifizierte  $\alpha$ -1,4-D-Glucane verwendet.

Die erfindungsgemäß verwendeten wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane können beliebigen Ursprungs sein.

Beispielsweise können die wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane aus natürlichen pflanzlichen und tierischen Quellen oder aus Mikroorganismen, die solche Glucane produzieren, durch konventionelle Isolierung und Aufreinigung erhalten werden.

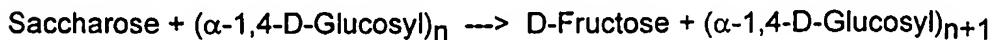
Da die meisten natürlichen Quellen die gewünschten wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane aber nicht in den gewünschten Mengen enthalten, werden diese Polysaccharide vorteilhaft auf biotechnischem Wege gewonnen. Beispielsweise können die natürlichen Produzenten der wasserunlöslichen linearen Glucane gentechnisch derart manipuliert werden, daß sie im Vergleich mit dem unmanipulierten Organismus einen höheren Anteil an nicht oder nur geringfügig verzweigten Polysacchariden enthalten.

Die gewünschten wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane können auch aus hochverzweigten Glucanen durch chemische oder enzymatische Entzweigung, beispielsweise mit Entzweigungsenzymen wie Pullulanasen erhalten werden.

Bevorzugt werden die erfindungsgemäß eingesetzten  $\alpha$ -1,4-D-Glucane durch Biotransformation oder biokatalytisch hergestellt.

Unter Biotransformation oder biokatalytischer Herstellung wird hier verstanden, daß das wasserunlösliche  $\alpha$ -1,4-D-Glucan in vitro durch katalytische Polymerisation von Glucosemolekülen unter Einwirkung eines geeigneten Enzyms, insbesondere eines Enzyms mit Amylosucrase-Aktivität, unter geeigneten Bedingungen hergestellt wird.

Ein vorteilhaftes biokatalytisches Verfahren zur Gewinnung wasserunlöslicher linearer  $\alpha$ -1,4-D-Glucane wird in der WO 95/31553 beschrieben, deren Offenbarungsgehalt ausdrücklich Gegenstand der vorliegenden Beschreibung ist. Nach dem Verfahren der WO 95/31553 wird das  $\alpha$ -1,4-D-Glucan mittels eines 5 biokatalytischen Verfahrens aus Saccharose unter Einwirkung eines Enzyms mit Amylosucrase-Aktivität, insbesondere mit einer Amylosucrase aus Bakterien der Spezies *Neisseria polysaccharea*, hergestellt. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpften Glucanen, indem sie unter Freisetzung von D-Fructose den Glucosylrest des Saccharosemoleküls gemäß dem folgenden 10 Reaktionsschema



auf die wachsende Polymerkette übertragen.

15 Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Gewinnung wasserunlöslicher linearer  $\alpha$ -1,4-D-Glucane auf Grundlage des obigen Reaktionsschemas wird in der älteren, nicht vorveröffentlichten deutschen Patentanmeldung DE-A-198 27 978.1 beschrieben, deren Offenbarungsgehalt ausdrücklich Gegenstand der 20 vorliegenden Beschreibung ist. Hierbei werden die wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane aus Saccharose mittels Enzymen mit Amylosucrase-Aktivität, bevorzugt aus *Neisseria polysaccharea*, in wässrigen, pufferfreien Systemen synthetisiert. Die Reaktion kann auch in Gegenwart eines wasserlöslichen 25 linearen oder verzweigten  $\alpha$ -1,4-D-Glucans, beispielsweise eines wasserlöslichen Dextrins oder einer wasserlöslichen Amylose durchgeführt, da solche Glucane als Glucosylgruppenakzeptoren wirken, an denen das Enzym eine  $\alpha$ -1,4-Glucankettenverlängerung katalysiert.

30 Bei einer solchen Kettenverlängerung entstehen auch aus verzweigten Polysacchariden wasserunlösliche lineare Polysaccharide im Sinne der vorliegenden Erfindung, da der Verzweigungsgrad des Glucosylgruppenakzeptors mit zunehmender Kettenverlängerung, also zunehmendem Polymerisationsgrad stark abnimmt. Zu diesem Zweck wird die Saccharose in großem molaren

Überschuß zum Akzeptor eingesetzt. Auf diese Weise lassen sich  $\alpha$ -1,4-D-Glukane mit einem Molekulargewicht im Bereich von  $0,75 \times 10^2$  g/mol bis  $10^7$  g/mol herstellen. Die linearen oligomeren oder polymeren Akzeptoren können dabei entweder von außen zugesetzt werden, sie können jedoch auch durch die

5 Amylosucrase selbst aus Saccharose erzeugt werden.

Die Bildung der resistenten Stärke erfolgt durch Retrogradierung der nichtresistenten wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane.

10 Die Retrogradierung der  $\alpha$ -1,4-D-Glucane kann nach an sich bekannten Verfahren erfolgen, beispielsweise durch Erhitzen oder Extrusion.

15 Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Herstellung resistenten Stärke wird in der älteren, nicht vorveröffentlichten DE-A-198 30 618 beschrieben, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird und deren Offenbarung Gegenstand der vorliegenden Beschreibung bildet. Dieses Verfahren ist einfach durchzuführen und liefert  $\alpha$ -1,4-D-Glucanpräparationen mit einem hohen Anteil resistenten Stärke.

20 In einer vorteilhaften Ausführungsform entsprechend der genannten DE-A-198 30 618 erfolgt die Herstellung der resistenten Stärke dadurch, daß zunächst eine wäßrige Suspension oder Dispersion der  $\alpha$ -1,4-D-Glucane hergestellt wird. Diese Suspension oder Dispersion wird anschließend erwärmt, beispielsweise auf eine Temperatur von 50°C bis 100°C, und dann wird der erhaltene Kleister auf eine Temperatur von vorzugsweise im Bereich von 35°C bis zum Gefrierpunkt abgekühlt, bei der das  $\alpha$ -1,4-D-Glucan retrogradiert, und dann gegebenenfalls getrocknet.

25 Die Begriffe "Suspension", "Dispersion" und Kleister haben hierbei die dem Fachmann geläufige Bedeutung (s.a. Römpf, Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Thieme-Verlag).

30 In einer anderen Ausführungsform entsprechend der DE-A-198 30 618 erfolgt die Herstellung der resistenten Stärke dadurch, daß die wäßrige Suspension oder

Dispersion der  $\alpha$ -1,4-D-Glucane eingefroren wird, wobei das  $\alpha$ -1,4-D-Glucan retrogradiert wird. Nach dem Auftauen wird dann gegebenenfalls getrocknet oder entwässert.

5 Die vollständige oder teilweise Retrogradierung der wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane und die Bildung resisterter Stärke kann erfolgen, bevor die  $\alpha$ -1,4-D-Glucane mit den Lebens- und Futtermitteladditiven zusammengegeben werden, sie kann während des Zusammenbringens der Bestandteile der  
10 Zusammensetzung erfolgen oder sie kann in der Mischung aus wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen, Additiven und gegebenenfalls weiteren Bestandteilen erfolgen.

Unter Lebens- und Futtermitteladditiven werden hier sowohl Stoffe als auch  
15 Mikroorganismen verstanden, die Lebens- oder Futtermitteln zur Beeinflussung oder zur Erzielung bestimmter Eigenschaften oder Wirkungen zugesetzt werden. Darunter fallen insbesondere Additive, die einen positiven Effekt auf die  
Gesundheit und das Wohlbefinden von Mensch und Tier haben.

20 Die Lebens- und Futtermitteladditive können Probiotika, Prebiotika oder sonstige Zusatzstoffe sein.

Unter Probiotika werden nicht-pathogene Mikroorganismen verstanden, die dem Lebens- oder Futtermittel lebend oder in Sporenform zugesetzt werden und die die Darmflora positiv beeinflussen können.

25 Beispiele für als Probiotika geeignete Mikroorganismen sind insbesondere Bakterien und Pilze. Bevorzugte Mikroorganismen sind Milchsäurebakterien, insbesondere der Gattung *Lactobacillus*, beispielsweise *Bifidobakterien*, Mikroorganismen der Gattung *Streptococcus*, beispielsweise *Enterococcus*-  
30 Stämme, und Hefen, beispielsweise der Gattung *Saccharomyces*, insbesondere der Spezies *Saccharomyces boulardii*.

Unter Prebiotika werden nicht verdauliche Stoffe verstanden, die dem Lebens- oder Futtermittel zugesetzt werden und die das Wachstum von bestimmten Bakterien im Dickdarm fördern.

5 Beispiele für Prebiotika sind insbesondere Ballaststoffe, beispielsweise Nahrungsfasern wie Oligo- und Polysaccharide, beispielsweise Inulin, Oligofruktosen, Oligofructane und Fructo-Oligosaccharide.

10 Sonstige Zusatzstoffe sind Vitamine und Provitamine, insbesondere Vitamin A, die Vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> und B<sub>12</sub>, Vitamin C, Vitamin D, Vitamin E, Vitamin F und Vitamin K; Antioxidantien; Öle, Fette und Fettsäuren, insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren, beispielsweise  $\Omega$ -3-Fettsäuren oder essentielle Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure; sowie Kräuter und Extrakte.

15 Bevorzugt können Kombinationen von  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen und/oder resisterter Stärke und Lebens- und Futtermitteladditiven eingesetzt werden, die einerseits die technischen Voraussetzungen zur Verarbeitung des Lebensmittels nicht verändern und andererseits das Eigenschaftsbild des Lebensmittels nicht wesentlich beeinflussen. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn der kalorische 20 Haushalt des Lebensmittels durch die funktionellen Additive nicht verändert wird. Dies wird entweder erreicht, indem beide oder mehrere funktionelle Additive gegenüber speziellen Eigenschaften neutral sind oder der positive oder negative Effekt des einen funktionellen Inhaltsstoffs durch den negativen oder positiven Effekt des anderen funktionellen Inhaltsstoffs gerade aufgehoben wird.

25 Besonders vorteilhaft sind Zusammensetzungen, die neben dem wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucan und/oder der resistenten Stärke, die selbst ein Prebiotikum darstellt, Probiotika enthalten. Bevorzugt ist das Probiotikum ein Bifidobakterium. Diese Kombination führt zu einem unerwarteten symbiotischen Effekt, indem die resistente Stärke von den intestinalen 30 Mikroorganismen unter Bildung kurzkettiger Fettsäuren verdaut wird, die wiederum als Nährstoff für die Bifidobakterien dienen und deren Proliferation fördern.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen kann durch einfaches Mischen erfolgen.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform dient das wasserunlösliche lineare  $\alpha$ -1,4-D-Glucan oder die daraus erhältliche resistente Stärke als Träger für wenigstens ein Lebens- oder Futtermitteladditiv.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform liegt das wasserunlösliche lineare  $\alpha$ -1,4-D-Glucan oder die daraus erhältliche resistente Stärke in Form von 10 Mikropartikeln, insbesondere sphärischen Mikropartikeln vor, die ganz oder teilweise aus dem Glucan bestehen. Dies ist besonders vorteilhaft, wenn das wasserunlösliche lineare  $\alpha$ -1,4-D-Glucan oder die daraus erhältliche resistente Stärke als Träger für das Lebens- und Futtermitteladditiv dienen soll.

15 Unter sphärischen Mikropartikeln werden hierbei annähernd kugelförmige Mikropartikel verstanden, deren Abweichung in den Achsenlängen vom Idealzustand einer Kugel, die durch von einem gemeinsamen Ursprung ausgehende, in den Raum gerichtete Achsen gleicher Länge, die den Radius der Kugel in allen Raumrichtungen definieren, beschrieben wird, nicht mehr als 40% 20 beträgt. Bevorzugt werden sphärische Mikropartikel mit Abweichungen von nicht mehr als 25%, besonders bevorzugt nicht mehr als 15% verwendet.

25 Die spezifische Oberfläche der Mikropartikel liegt zweckmäßig in einem Bereich von  $1 \text{ m}^2/\text{g}$  bis  $100 \text{ m}^2/\text{g}$ , bevorzugt von  $1,5 \text{ m}^2/\text{g}$  bis  $20 \text{ m}^2/\text{g}$  und besonders bevorzugt von  $3 \text{ m}^2/\text{g}$  bis  $10 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Der mittlere Durchmesser (Zahlenmittelwert) der Mikropartikel liegt zweckmäßig in einem Bereich von  $1 \text{ nm}$  bis  $100 \mu\text{m}$ , bevorzugt von  $100 \text{ nm}$  bis  $10 \mu\text{m}$  und besonders bevorzugt von  $1 \mu\text{m}$  bis  $5 \mu\text{m}$ .

30 Die Dispersität  $D = d_W/d_N$  der Mikropartikel, worin  $d_W$  den Gewichtsmittelwert des Durchmessers und  $d_N$  den Zahlenmittelwert des Durchmessers der Mikropartikel

bedeutet, liegt zweckmäßig in einem Bereich von 1 bis 10, vorzugsweise von 1,5 bis 5 und bevorzugt von 2 bis 3. Die Mittelwerte  $d_n$  und  $d_w$  sind definiert als

$$d_n = \sum n_i \times d_i / \sum n_i; \text{ und}$$

$$d_w = \sum n_i \times d_i^2 / \sum n_i \times d_i$$

worin

$d_i$  den Durchmesser der Partikel der Spezies  $i$  bedeutet;

$n_i$  die Anzahl der Partikel  $i$  mit dem Durchmesser  $d_i$ ; und

$i$  einen fortlaufenden Parameter bedeutet.

Der Begriff Gewicht steht in diesem Zusammenhang nicht für Masse sondern für ein gewichtetes Mittel, wodurch die größeren Durchmesser einen höheren

Stellenwert erhalten. Durch den Exponenten 2 werden Durchmesser größerer

Partikel stärker gewichtet.

Die Bildung von Mikropartikeln, die ganz oder teilweise aus resistenter Stärke bestehen, kann beispielsweise durch einfaches Vermahlen der resistenten Stärke, die aus dem oben beschriebenen Kleister erhalten wurde, erfolgen.

Weitere Verfahren zur Herstellung von Mikropartikeln werden in den älteren deutschen Patentanmeldungen DE-A-197 37 481.6, DE-A-198 39 214.1, DE-A-198 39 216.9 und DE-A-198 39 212.5 beschrieben, auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird und deren Offenbarung ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Beschreibung bildet.

Die Herstellung der bevorzugt sphärischen Mikropartikel erfolgt zweckmäßig durch Lösen der wasserunlöslichen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane oder der daraus erhältlichen resistenten Stärke in einem lebensmitteltechnologisch unbedenklichen Lösungsmittel, beispielsweise durch Lösen in wässrigem Alkali, Einbringen der Lösung in ein Fällmittel, vorzugsweise Wasser, Kühlen des dabei entstehenden

Gemisches auf vorzugsweise 10°C bis -10°C und Abtrennen der gebildeten Mikropartikel.

Struktur und Oberfläche der Mikropartikel können durch die Art des Fällmittels gesteuert werden. Durch die Mitverwendung geeigneter, insbesondere in der Lebensmitteltechnologie zugelassener Zusatzstoffe, beispielsweise Zuckern wie Fructose, Saccharose und Glucose, kann ebenfalls Einfluß auf Struktur, Größe und Oberfläche der Partikel genommen werden.

Die Konzentration des  $\alpha$ -1,4-D-Glucans oder der resistenten Stärke in der Lösung kann in einem weiten Bereich variieren und beträgt vorzugsweise ungefähr 0,1 bis 1 g pro ml Lösungsmittel.

Mikropartikel mit einer mittleren Größe von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 3  $\mu\text{m}$  lassen sich bei diesem Verfahren vorteilhaft erhalten, wenn man dem Fällmittel ein heißwasserlösliches  $\alpha$ -D-Glucan zusetzt.

Die Porosität der Mikropartikel lässt sich auch durch die Wahl des Verfahrens zur Herstellung des wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucans steuern. So kann beispielsweise der Zusatz von Hilfsstoffen bei der biotechnologischen Herstellung der Polysaccharide die Porosität der aus solchen Polysacchariden erhaltenen Mikropartikel beeinflussen. Insbesondere wurde gefunden, daß die Porosität von Mikropartikeln, die ganz oder teilweise aus den wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen gebildet werden, erhöht werden kann, wenn die Herstellung des Glucans aus Saccharose mittels Amylosucrase in Gegenwart eines Glucosylgruppenakzeptors, beispielsweise Dextrin, erfolgt. Dabei werden die Mikropartikel umso poröser, je höher die Konzentration des Glucosylgruppenakzeptors bei der Biotransformation ist.

Das Aufbringen der Lebens- und Futtermitteladditive auf das Trägermaterial kann beispielsweise bei flüssigen Lebens- und Futtermitteladditiven wie ungesättigten Fettsäuren durch einfaches Mischen erfolgen. Die Additive können aber auch dem Fällbad zugegeben werden, aus dem man die Mikropartikel gewinnt. Bei der

Bildung der Mikropartikel adsorbieren die Additive dann auf der Oberfläche der Partikel.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform werden die Lebens- und  
5 Futtermitteladditive mit den wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen oder der resistenten Stärke wenigstens teilweise ummantelt oder verkapselt. Auf diese Weise wird nicht nur die synergistische oder symbiotische Wirkung verstärkt, sondern auch ein zusätzlicher stabilisierender Effekt erreicht. Besonders vorteilhaft ist diese Ausführungsform bei einer Kombination von  
10 wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen und/oder resisternter Stärke mit Probiotika, wobei die lebenden Organismen mittels einer Schicht aus resisternter Stärke und gegebenenfalls anderen Polysacchariden verkapselt und dadurch auch vor schädlichen Einflüssen, die beispielsweise während der Verarbeitung von Nahrungsmitteln auftreten, geschützt werden.

15 Die Ummantelung kann in an sich bekannter Weise durch wäßrige Dispersions- oder Suspensionsprozesse erfolgen.

20 Die Zusammensetzungen können ausschließlich aus den wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen und/oder den daraus erhältlichen resistenten Stärken und den jeweiligen Additiven bestehen oder weitere Zusatzstoffe, beispielsweise weitere Nahrungsergänzungsmittel enthalten.

25 Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können die wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucane in nicht  $\alpha$ -Amylase-resisternter Form, in Form der daraus erhältlichen resistenten Stärke oder in Form von Mischungen daraus enthalten.

30 In einer möglichen Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Zusammensetzung die Glucane überwiegend als wasserunlösliche lineare  $\alpha$ -1,4-D-Glucane, also in nicht  $\alpha$ -Amylase-resisternter Form. Solche Zusammensetzungen eignen sich beispielsweise zur Herstellung von Lebensmitteln und Lebensmittelvorprodukten, in denen die resistenten Stärke erst

durch eine Weiterbehandlung oder eine Verarbeitung vor dem Verzehr, beispielsweise durch Erwärmen, gebildet wird.

In einer weiteren Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Zusammensetzung die Glucane überwiegend in Form resistenter Stärke. Solche Zusammensetzungen können den Nahrungsmitteln beispielsweise auch nach Verarbeitungsschritten wie Erwärmen oder Erhitzen zugegeben werden. In solchen Zusammensetzungen wird der Gehalt an resisterter Stärke, bezogen auf die Gesamtmenge an  $\alpha$ -1,4-D-Glucan, möglichst hoch gewählt. Zweckmäßig

5 beträgt der Gehalt, wie bestimmt nach Englyst (siehe supra), wenigstens 25 Gew.-%, bevorzugt wenigstens 65 Gew.-%, insbesondere 75%, und besonders bevorzugt wenigstens 90 Gew.-%, insbesondere 95 bis 99 Gew.-% und mehr.

10 15 Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können in einer Vielzahl von Nahrungsmitteln eingesetzt werden. Beispiele für geeignete Lebensmittel sind Milch und Milchprodukte wie Yoghurt, Quark oder Schnitten und Pudding; Brot, Aufstriche, Getränke, Müsliriegel, Cerealien, Kekse, Kuchen, Gebäck, Soßen, Nudeln, Kartoffelpüree und andere Kartoffelgerichte wie Pommes Frites, Aufläufe, Verdicker, Designer Drinks, Getränkepulvern und Fertiggerichten.

20 25 Resistente Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer  $\alpha$ -1,4-D-Glucane und ihre Zusammensetzungen können als Ersatzstoff für Nahrungsmittelinhaltstoffe verwendet werden, insbesondere als Fettstoffersatz, und damit als Kalorienreduktionsmittel dienen. Sie können auf diese Weise eine Zellstimulation bewirken und den Appetit beeinflussen.

Der Abbau der resistenten Stärke im Darm zu kurzkettigen Fettsäuren, insbesondere zu besonders vorteilhaftem Butyrat, ihre Eignung als Ersatzstoff und die synergistischen und symbiotischen Effekte in Kombination mit anderen Lebens- oder Futtermitteladditiven sind jedoch nicht der einzige Vorteil bei der Verwendung resisterter Stärke in Nahrungsmitteln. Resistente Stärke kann nämlich insbesondere zusammen mit anderen Lebens- oder Futtermitteladditiven

auch dazu benutzt werden, die Eigenschaften der Lebensmittel zu verbessern. So kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung, abhängig von der Wahl der Additive, zu einer Erhöhung der Gelbildung, einer Verbesserung der Fließeigenschaften, einer Erhöhung oder Erniedrigung der Viskosität, einer Verbesserung des Sorptionsverhaltens, einer Erhöhung oder Verringerung der Quelleigenschaften und einer Verbesserung der Verkleisterungstemperatur von Produkten führen, die Polysaccharide enthalten. Ebenso kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung eingesetzt werden, um die Löslichkeit, die Transparenz und die Textur der Kleisterstruktur zu beeinflussen und die Wärme-, 5 Kälte-, Säure- und Scherstabilitäten der Produkte zu verbessern. Ferner kann der Einsatz der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen die Filmbildungstendenz erhöhen, die Gefrier- und Taustabilitäten positiv beeinflussen und die Verdaulichkeit verbessern. Daneben können auch kaschierende Effekte zum 10 Tragen kommen, die sich auf den geschmack, das sog. Mundgefühl (mouth feel) oder den Geruch begründen. 15

Die Tatsache, daß die aus wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen erhältlichen resistenten Stärken bei der Verdauung einen überaus hohen Gehalt an für die Darmflora günstigen Butyraten liefert, macht diese Stärke auch für die 20 Verwendung in medizinischen und veterinärmedizinischen Präparaten geeignet, insbesondere in Kombination mit anderen funktionellen Additiven, beispielsweise den oben erwähnten Lebens- und Futtermitteladditiven, aber auch zusammen mit anderen Heilmitteln. Die Verwendung von resisterter Stärke auf Basis 25 wasserunlöslicher linearer  $\alpha$ -1,4-D-Glucane als Arzneimittel, allein oder in Kombination mit anderen funktionellen Additiven, wirkt sich auf zahlreiche Krankheitsbilder positiv aus. So eignen sich Arzneimittel auf Basis der erfindungsgemäßen resistenten Stärke beispielsweise zur Behandlung von 30 Herzerkrankungen, Magen-Darm-Erkrankungen, Arthritis, immunologischen Erkrankungen, mentalen Dysfunktionen, Nervenerkrankungen, psychischen Störungen, Schlafstörungen, Erkrankungen der Muskulatur, Krankheiten, die den Hormonhaushalt beeinflussen, Schilddrüsenerkrankungen, Krankheiten der inneren Organe, Veränderungen des Blutbilds, Kreislauferkrankungen, Allergien, Hauterkrankungen und Erkrankungen, die auf Mangelernährung zurückzuführen

sind. Ebenso können Präparate mit resistenter Stärke als Appetitzügler eingesetzt werden.

Dementsprechend ist resistente Stärke auf Basis wasserunlöslicher  $\alpha$ -1,4-D-Glucane, allein oder in Kombination mit anderen funktionellen Additiven, auch als 5 Arzneimittel einsetzbar, und zwar sowohl als Therapeutika als auch als Prophylaktika oder Diagnostika. Die medizinischen, resistente Stärke enthaltenden Präparate können hierbei übliche Hilfs- und Trägerstoffe enthalten und in den üblichen Darreichungsformen, beispielsweise in Form von Tabletten, 10 Depot-Formulierungen oder Mitteln mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung vorliegen.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele näher erläutert:

15 Beispiele

Beispiel 1

Herstellung von  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen

20 In ein 5-l-Gefäß wurden 5 l einer sterilisierten 30%igen Saccharose Lösung gegeben. Ein Enzymextrakt, der eine Amylosucrase aus *Neisseria polysaccharea* enthielt (WO-A-95/31553), wurde in einer Portion zugegeben und es wurde 25 gemischt. Die eingesetzte Enzymaktivität betrug in diesem Experiment 148000 Units. Das verschlossene Gefäß wurde bei 37°C inkubiert. Während der Dauer der Biotransformation bildete sich ein weißer Niederschlag. Die Reaktion wurde nach 39 h beendet. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, bei -70°C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die Masse des gefriergetrockneten Feststoffes betrug 526,7 g (70,2 % Ausbeute).

30 Zur Abtrennung niedermolekularer Zucker wurden 200 g des Feststoffes mit Wasser 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen, bei -70 °C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Fruktose und Saccharose wurde

nach Lösen des Feststoffes in DMSO durch einen gekoppelten enzymatischen Assay bestimmt und betrug 4,61 mg Fruktose pro 100 mg Feststoff (4,6%). Der Gehalt an Saccharose lag unter der Nachweisgrenze.

5 Der Überstand der Biotransformation wurde bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert. Der klare Überstand wurde bei -70°C eingefroren und über 3 Tage bei 4 °C aufgetaut. Der so erzeugte Niederschlag wurde bei -70 °C eingefroren und gefriergetrocknet.

10 Zur Abtrennung niedermolekularer Zucker wurden 39,5 g des Feststoffes mit Wasser 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur gewaschen, bei -70°C eingefroren und gefriergetrocknet. Der Gehalt an Fruktose und Saccharose wurde nach Lösen des Feststoffes in DMSO durch einen gekoppelten enzymatischen Assay gemäß STITT et al. (Meth. Enzym., 174 (1989) 518 - 552) bestimmt und betrug 2,27 mg Fruktose pro 100 mg Feststoff. Der Gehalt an Saccharose lag unter der Nachweisgrenze.

15

## Beispiel 2

### 20 Bestimmung des Molekulargewichts des nach Beispiel 1 erhaltenen Materials

Es wurden 2 mg des  $\alpha$ -1,4-D-Glucans aus Beispiel 1 bei Raumtemperatur in Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a. von Riedel-de-Haen) gelöst und filtriert. Ein Teil der Lösung wurde in eine Säule zur Gelpermeationschromatographie injiziert. Als Elutionsmittel wurde DMSO verwendet. Die Signalintensität wurde mittels eines RI-Detektors gemessen und gegen Pullulanstandards (Firma Polymer Standard Systems) ausgewertet. Die Flußrate beträgt 1.0 ml pro Minute.

30 Die Messung ergibt ein Zahlenmittel des Molekulargewichts (Mn) von 2.326 g/mol und ein Gewichtsmittel des Molekulargewichts (Mw) von 3.367 g/mol. Die Wiederfindungsrate beträgt 100 %.

## Beispiel 3

## Bestimmung des RS-Gehaltes

5 200 mg (Trockengewicht) des auf seinen RS-Gehalt zu analysierenden  
pulverförmigen Produktes wurden nach der Methode von Englyst et al. (Eur. J.  
Clin. Nutrition, 46 (1992) (Suppl. 2) S 33-550) zur Bestimmung des RS-Gehaltes  
mit der beschriebenen Enzymmischung bei pH 5,2 120 min inkubiert. Nach  
Beendigung des enzymatischen Abbaus wurde die Aktivität der Enzyme durch  
10 Erniedrigung des pH-Wertes auf einen Wert von 3 und der Temperatur auf 20°C  
gestoppt. Anschließend erfolgte durch Zugabe der 4-  
fachen Menge an Ethanol die Einstellung einer 80%igen (v/v) ethanolischen  
Lösung. Die 80%ige ethanolische Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur  
stehengelassen. Das Präzipitat wurde zentrifugiert (2500 x g, 10 min) und der  
15 Überstand verworfen. Der Rückstand wurde dreimal mit 80%igem (v/v) Ethanol  
und einmal mit absolutem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Der Rückstand  
wurde lyophilisiert und gewogen. Die Trockenmasse des Rückstandes wurde  
bestimmt und der RS-Gehalt nach folgender Gleichung berechnet:

20 RS [%] = 100 x Gewicht des Rückstandes (Trockengewicht)/Einwaage  
(Trockengewicht)

## Beispiele 4 bis 7

25 Ein lineares, naturidentisches  $\alpha$ -1,4-D-Glukan nach Beispiel 1 wurde in wässriger  
Lösung erhitzt und ein Kleister gebildet. Dieser Kleister wurde auf 10 Gew.-%  
Feststoffanteil eingestellt und portioniert. Die Portionen wurden bei 4 und 25°C  
(Beispiel 5 bzw. 6) oder mit Hilfe eines Stufenprogramms (Beispiel 7)  
retrogradiert. Des weiteren wurde das lineare Kohlenhydratpolymer aus dem  
30 Reaktionsansatz ausgefroren (Beispiel 4). Die retrogradierten Muster wurden  
getrocknet und die Bestimmung des RS-Gehaltes wie oben beschrieben  
durchgeführt.

Tabelle 1 illustriert den Einfluß der Retrogradationstemperatur und -bedingungen auf den RS-Gehalt im Produkt, hergestellt aus einem 10-proz. Kleister der verwendeten  $\alpha$ -1,4-D-Glucane durch 24-stündige Retrogradation.

5 Tabelle 1

Beispiel	Retrogradationstemperatur	RS (Gew.-%)
4	-70°C	78 ± 4
5	4°C	70 ± 2
10 6	25°C	87 ± 1
7	Stufenprogramm	74 ± 3

Das Beispiel in Tabelle 1 zeigt, daß die Retrogradationstemperatur den RS-Gehalt beeinflußt. So führt eine Retrogradation bei 25 °C zu einem deutlich höheren RS-Anteil verglichen mit einer Retrogradation bei 4 °C. Durch Retrogradation bei -70 °C erhält man hingegen einen leicht höheren RS-Anteil verglichen mit dem nach Retrogradation bei 4°C.

#### Beispiel 8

Bestimmung der Löslichkeit der von  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen und Klassifizierung nach 20 Deutschem Arzneimittelbuch (DAB)

564 mg  $\alpha$ -1,4-D-Glucan aus Beispiel 1 wurden in ca. 0,5 l bidestilliertem Wasser bei 1,3 bar und 130 °C für 1,5 Stunden in einem Autoklaven erhitzt (Apparat Certoclav). Von dem Reaktionsgefäß ist zuvor das Gewicht gemessen worden.

25 Danach wird die Apparatur entspannt und bei Raumtemperatur abgekühlt. Der Inhalt wird gewogen. Er entspricht 501,74 g. Nach weiteren 24 Stunden wird zentrifugiert und dekantiert. Der feste Rückstand wird getrocknet und ausgewogen. Es sind 468 mg. Daraus errechnet sich ein gelöster Anteil von 96 mg. Bezogen auf das eingesetzte Lösungsmittel errechnet sich daraus, daß für 1 mg  $\alpha$ -1,4-D-Glukan 5226 mg Wasser notwendig sind. Gemäß der Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch ergibt sich daraus die Einteilung, daß diese Substanz "sehr schwer löslich" ist, da zwischen 1.000 und 10.000 Teilen

Lösungsmittel notwendig sind, um 1 Teil der Substanz in Lösung zu bringen. Dies entspricht der Löslichkeitsklasse 6 nach DAB.

#### Beispiel 9

5 Bestimmung der Löslichkeit von  $\alpha$ -1,4-D-Glucanen und Klassifizierung nach Deutschem Arzneimittelbuch (DAB)

Der Versuch wurde mit einem auf ähnliche Weise wie in Beispiel 1 erhaltenen  $\alpha$ -1,4-D-Glucan entsprechend Beispiel 8 durchgeführt. Den einzigen Unterschied bildete ein Kühlprozeß, der nach der Autoklavbehandlung und dem Abkühlen auf Raumtemperatur nachgeschaltet wurde. Das Substanzgemisch wird für 3 Stunden bei 5 °C aufbewahrt.

10 Es wurden 526 mg  $\alpha$ -1,4-D-Glukan auf ca. 480 ml bidestilliertem Wasser eingewogen. Nach der thermischen Behandlung ergab sich eine Auswaage von 468,09 g. Das getrocknete Sediment betrug 488 mg. Demnach waren 38 mg des  $\alpha$ -1,4-D-Glukan in Lösung gegangen. Dies entsprach einem Verhältnis von 1 mg Substanz zu 12.305 Teilen Lösungsmittel. Demnach war die Substanz nach dieser Behandlungsmethode in Klasse Nummer 7 nach DAB einzustufen und danach als praktisch unlöslich zu klassifizieren, weil mehr als 10.000 Teile Lösungsmittel für ein Teil Substanz benötigt wurden.

#### Beispiel 10

25 Herstellung von Müsliriegeln mit resistenter Stärke

Es wurden Müsliriegel mit wechselnden Mengen resistenter Stärke (RS) hergestellt.

30 Grundrezept: 40% Honig  
30% Haferflocken  
6% Sonnenblumenkerne  
9% Haselnüsse  
6% Haferfleks  
35 9% Schokoladeblättchen

5                    a)                    40% Honig  
                      30% Haferflocken  
                      6% Sonnenblumenkerne  
                      9% Haselnüsse  
                      6% Haferfleks  
                      9% Schokoladeblättchen  
                      3% Amylose (RS)

10                b)                    40% Honig  
                      24% Haferflocken  
                      6% Sonnenblumenkerne  
                      9% Haselnüsse  
                      6% Haferfleks  
                      6% Schokoladeblättchen  
                      9% Amylose (RS)

15                c)                    36% Honig  
                      24% Haferflocken  
                      6% Sonnenblumenkerne  
                      9% Haselnüsse  
                      6% Haferfleks  
                      6% Schokoladeblättchen  
                      9% Amylose (RS)  
                      4% Hochungesättigte Fettsäuren

20                d)                    40% Honig  
                      21% Haferflocken  
                      6% Sonnenblumenkerne  
                      9% Haselnüsse  
                      6% Haferfleks  
                      6% Schokoladeblättchen  
                      12% Amylose (RS)

25

30

35

40                Die Zutaten wurden gut gemischt und ca. 4 Std. bei 70°C im Trockenschrank oder  
                      Ofen gebacken. Die Müsliriegel waren auch bei einem Gehalt an resistenter  
                      Stärke in ihrer Konsistenz von den Riegeln nach dem Grundrezept nicht zu  
                      unterscheiden und wohlschmeckend.

## Beispiel 11

Untersuchung der Bildung kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) durch in vitro-Fermentation der  $\alpha$ -Amylase resistenten Anteile durch frisch entnommene  
5 Faecesproben.

1 ml einer 5%igen Faecessuspension (15g frisch entnommenen Humanfaeces in  
50 ml Soerensen-Puffer, pH 6,5; Puffer aus Kaliumhydrogenphosphat und  
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat) wurden in mit Stickstoff begasten Cryo-  
10 Röhrchen mit je 10 mg, durch enzymatische Hyrolyse isolierten, resistenten  
Strukturen entsprechend Beispiel 1 und, als Vergleich, von Novelose,  
retrogradierter Maisstärke, National Starch & Chemical, USA, gemischt und  
homogenisiert. Die Fermentation erfolgte bei 37°C. Es wurden stündlich Proben  
entnommen und eingefroren.

15 Die Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren wurde in einer Faecessuspension  
mit Hilfe der Gaschromatographie auf einer Kapillarsäule (Carbowax 20M) unter  
Nutzung eines Temperaturprogramms bestimmt. Als GC-System wurde eine HP  
5890 Series II-Station mit HP 7673 GC/SCF-Injektor, HP GC-  
20 Autosamplercontroller, Detektor FID; Software - HP Chemstation, verwendet.  
Helium wurde als mobile Phase benutzt.

25 200 mg der Faecessuspension wurden mit der vierfachen Menge Wasser  
suspendiert und homogenisiert. Von dieser verdünnten Arbeitsfaecessuspension  
wurde ein Teil für die Trockenmassebestimmung verwendet.

500 mg der Arbeitsfaecessuspension wurden zentrifugiert. 100  $\mu$ l des  
Überstandes wurden mit 25  $\mu$ l 1M Natriumhydroxidlösung versetzt. Das  
verschlossenen Gefäß wurde mit durchbohrtem Deckel in flüssigen Stickstoff  
30 gegeben und gefriertrocknet. Die getrocknete Probe wurde mit 100  $\mu$ l 5M  
Ameisensäure und 400  $\mu$ l Aceton versetzt und auf einem Vortex geschüttelt. Die  
sich bildende organische Phase wurde in Vials eines Autosamplers dekantiert, die  
sofort verschlossen wurden. Aus ihnen wurde je 1  $\mu$ l in eine GC injiziert. Als

externe Standards wurden Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, iso-Buttersäure, Valeriansäure und iso-Valeriansäure (Sulpeco) verwendet.

Die Fermentation der resistenten Strukturen wurden parallel in

5 Doppel fermentationsstudien durchgeführt.

Die Fermentierbarkeit der eingesetzten Strukturen erwies sich als unterschiedlich.

Insbesondere unterschieden sich die Bildungsraten und die Spektren der kurzkettigen Fettsäuren.

10

Durch in vitro-Fermentation der resistenten Strukturen entsprechend Beispiel 1 wurden deutlich höhere Spiegel an kurzkettigen Fettsäuren und an Butyrat in vergleichbaren Fermentationszeiten erreicht. Während durch 8stündige Fermentation der resistenten Strukturen entsprechend Beispiel 1 ein SCFA-Spiegel von ca. 2000 µmol/g Trockengewicht eingestellt wurde, wobei der Butyratgehalt ca. 60% betrug, lag der SCFA-Spiegel nach gleicher Fermentationszeit resisterter Strukturen aus Novelose nur bei ca 750 µmol Trockengewicht. Das Butyrat war dabei mit einem Anteil von ca 35% vertreten. Durch die Fermentation resisterter Strukturen des erfindungsgemäß als Ausgangsprodukt eingesetzten wasserlöslichen α-1,4-D-Glucans wird also schneller und mehr Butyrat erzeugt als durch resisteute Stärke von Novelose.

#### Beispiel 12

25 Einfluß einer Kombination von resisterter Stärke und Bifido Bakterien auf die Aktivität und das Wachstum von Bifidobakterien sowie Darmzellen

Zur Austestung des Einflusses der Kombination von resisterter Stärke und Bifido Bakterien auf die Darmflora wurden 10 g resisternte Stärke, hergestellt wie in den 30 Beispielen 4 bis 7 beschrieben, an 5 gesunde Probanden zur oralen Aufnahme über einen Zeitraum von 14 Tagen verabreicht. Die Proben wurden während des Frühstücks in Form eines Bifidobakterien enthaltenden Joghurts verzehrt, in den das Polyglucan eingerührt wurde (Joghurt LC<sub>1</sub> der Firma Nestlé). Die Probanden hatten

ein Durchschnittsalter von 38,9 und ein durchschnittliches Gewicht von 67,3 kg. Die Untersuchungswerte wurden mit einer Kontrolle verglichen. Die Kontrollgruppe bestand aus den gleichen Probanden. Sie wurden 3 Monate vor der zweiten Untersuchung untersucht. Es wurde Joghurt mit Bifido Bakterien ohne RS aufgenommen. Bereits 10 Wochen vor dem Beginn der Kontrolluntersuchung und in den etwa 10 Wochen von der Beendigung der ersten Kontrolluntersuchung bis zur zweiten Untersuchung (RS-Bifido) haben die Probanden keinen Joghurt oder ähnliche Lebensmittel zu sich genommen, die Bifido Bakterien enthalten.

Die absolute Menge an Bifido Bakterien wurde gemäß einer erstmals in der folgenden Literatur publizierten Methode bestimmt ("A Color Atlas of Anaerobic Bacteria", 1984, Seiten 53 - 65, T. Mitsuoka (Hrsg.), Verlag Kabushiki Kaisha Sobunsha, Tokyo, Japan (1984)). Die gewachsenen Kolonien wurden in unterschiedlichen Medien kultiviert, nach dem Genotyp beurteilt und ausgezählt. Die Gesamtsumme aller Mikroorganismen wurde als die Gesamtsumme der Mikroorganismen jedes einzelnen Probanden angenommen. Die relative Anzahl der Bifido Bakterien wurde bestimmt, in dem die Zahl bei der Auszählung der Bifido Bakterien durch die Gesamtsumme dividiert und mit 100 multipliziert wurde. Die relative Veränderung der Gesamtsumme der Bifido Bakterien wurde dadurch berechnet, daß die Zahl der Bifidos pro Gramm Faeces mit dem Gewicht der Faeces multipliziert wurde. Diese Zahl zu Beginn der Untersuchung wurde gleich 100 gesetzt. Der Vergleichswert nach 14 Tagen wurde zu diesem Normwert jedes einzelnen Probanden in Beziehung gesetzt. Die Werte der Untersuchung sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die relativen Anteile der Bifido Bakterien werden als Mittelwerte über die Zeit und die Probanden angegeben. Die relativen Anteile Bifido Bakterien in der Gesamtzahl der Mikroorganismen wird als Wert zur Basis 100, dem Wert vor der Behandlung mit LC<sub>1</sub> oder RS-Bifido, auf der Basis des 14-tägigen Endwerts angegeben. Die Ergebnisse zeigen, daß ein Anstieg der täglichen Faecesmenge auftritt und zwar ein höherer Anstieg bei Verwendung von RS-Bifido. Die pH-Werte werden ca. um 0,5 abgesenkt. Weiterhin ist der positive Einfluß auf die Darmepithelzellen an dem starken Anstieg kurzkettiger Fettsäuren erkennbar. Dieser Effekt wird mit den Bifidobakterien allein nicht beobachtet.

Tabelle 2

	vor LC <sub>1</sub>	nach LC <sub>1</sub>	vor RS-Bifido	nach RS-Bifido
<b>Faeces Gewicht (g/Tag)</b>	125+/-29	137+/-35	127+/-32	148+/-35
<b>relative Änderung der Faeces Masse</b>	100	110	100	116
<b>Faeces pH-Wert</b>	6,6+/-0,5	5,9+/-0,5	6,5+/-0,5	6,0+/-0,5
<b>Gesamtzahl der Mikroorganismen pro g Faeces</b>	$8,5 \times 10^8+/-0,2^8$	$9,2 \times 10^8+/-0,2^8$	$8,6 \times 10^8+/-0,2^8$	$11,2 \times 10^8+/-0,2^8$
<b>relativer Anteil der Bifido Bakterien (%)</b>	9,9+/-0,2	10,3+/-0,2	9,9+/-0,2	13,9+/-0,2
<b>relativer Anteil der Bifidobakterien in der Gesamtzahl der Mikroorganismen</b>	100	195	100	255
<b>Acetat µmol/g Trockengewicht Faeces*</b>	365+/-15	335+/-15	387+/-15	1021+/-15
<b>Propionat µmol/g Trockengewicht Faeces*</b>	87+/-15	91+/-15	89+/-15	675+/-15
<b>Butyrat µmol/g Trockengewicht Faeces*</b>	99+/-15	100+/-15	102+/-15	617+/-15

\* nach 6 Stunden Fermentation (= Sättigungswert)

## Beispiel 13

Herstellung von hier z.B. Polyglucan Plätzchen mit verringertem Kaloriengehalt.

## 5 a) Vergleichsbeispiel

20 g Zucker und 50 g weiche Butter werden schaumig geschlagen. Dann werden ein halbes Ei, 50 g Weizenmehl, 30 g gemahlene Haselnüsse, 1 Teelöffel, ein wenig Zitronenschalen, 1 Teelöffel Backpulver und 1 Teelöffel Vanillezucker hinzugegeben. Die Masse wird gut gerührt, bis die Masse sehr trocken und krümelig ist. Es wird ein wenig Milch hinzugegeben und verrührt, so daß sich der Teig leicht aufnehmen läßt. 10 Es wird je ein Teelöffel der Masse auf ein Backblech geben. Im vorgeheizten Backofen (Heißluft) werden die Kekse bei 175°C ca. 15 Minuten gebacken.

Herstellung von Backwaren mit Weizenmehl (Vergleichsbeispiel) und Polyglucan

## 15 Plätzchen

## b)

Die Durchführung erfolgt wie in Beispiel 13a anstelle des Zuckers (Saccharose) wurde ca. 20 g Polyglucan verwendet (inklusive 1 Teelöffel Vanillezucker). Um eine 20 akzeptable Süße zu erreichen, wurde mit einem handelsüblichen Süßungsmittel (z.B. Natreen) in äquivalenter Dosierung gesüßt.

Testpersonen (8) bescheinigten, daß in dem mit dem Geschmack verbundenen Kriterien, wie Mundgefühl, crisp-Effekt, Konsistenz, Klebrigkeits-, Beiß- und Kaueffekte und -gefühl und Süße, kein erkennbarer Unterschied empfunden werden konnte, 25 bzw. wenn eine Differenz ausgemacht wurde, daß diese nicht als nachteilig gesehen worden ist. Die Backwaren in Form von Keksen sind wohlschmeckend. Damit ist eine Einsatzmöglichkeit als 'bulking agent', als Zuckerersatzstoff, vor allem in Speisen, aber auch Getränken, etwa Milch-Getränke, Trinkyoghurts, gegeben.

## Patentansprüche

1. Zusammensetzung, umfassend ein wasserunlösliches lineares  $\alpha$ -1,4-D-Glucan und/oder eine daraus erhältliche resistente Stärke und wenigstens 5 ein weiteres Lebens- oder Futtermitteladditiv.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin das wenigstens eine weitere Lebens- oder Futtermitteladditiv ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend 10 aus Probiotika, Prebiotika, Vitaminen und Provitaminen, Antioxidantien, Ölen und Fetten und Fettsäuren, sowie Mischungen daraus.

3. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, worin das wenigstens eine weitere Lebens- oder Futtermitteladditiv ein Probiotikum, insbesondere ein Bifidobakterium ist.

15 4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das wasserunlösliche lineare  $\alpha$ -1,4-D-Glucan und/oder die daraus erhältliche resistente Stärke als Trägermaterial für das wenigstens eine Lebens- und Futtermitteladditiv fungiert.

20 5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das wasserunlösliche lineare  $\alpha$ -1,4-D-Glucan und/oder die daraus erhältliche Stärke in Form von Mikropartikeln vorliegt.

25 6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin das Lebens- oder Futtermitteladditiv von dem wasserunlöslichen linearen  $\alpha$ -1,4-D-Glucan und/oder der daraus erhältlichen resistenten Stärke wenigstens teilweise ummantelt ist.

30 7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, worin das wasserunlösliche lineare  $\alpha$ -1,4-D-Glucan ein Molekulargewicht  $M_W$  von  $0,75 \times 10^2$  bis  $10^7$  g/mol, bevorzugt von  $10^3$  bis  $10^6$  g/mol und besonders bevorzugt von  $10^3$  bis  $10^5$  g/mol aufweisen.

8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 worin das wasserunlösliche lineare  $\alpha$ -1,4-D-Glucan erhältlich ist durch in-vitro Polymerisation von Glucose unter Einwirkung eines Enzyms mit Amylosucrase-Aktivität.  
5
9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, welche ein Nahrungsergänzungsmittel ist.  
10
10. Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Herstellung von Nahrungsmitteln oder Nahrungsmittelvorprodukten.  
15
11. Nahrungsmittel oder Nahrungsmittelvorprodukt, erhältlich unter Verwendung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9.  
13. Verwendung wasserunlöslicher linearer  $\alpha$ -1,4-D-Glucane und/oder daraus erhältlicher resistenter Stärke als Ersatzstoff und/oder Kalorienreduktionsmittel in Lebensmitteln.  
20
14. Resistente Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer  $\alpha$ -1,4-D-Glucane als Arzneimittel.  
25
15. Resistente Stärke nach Anspruch 14, worin das Arzneimittel ein Magen-Darm-Mittel ist.  
30
16. Pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zusammensetzung, umfassend einen Gehalt an resistenter Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer  $\alpha$ -1,4-D-Glucane.  
17. Zusammensetzung nach Anspruch 16, ferner umfassend ein weiteres funktionelles Additiv.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, worin das funktionelle Additiv ein Lebens- oder Futtermitteladditiv ist, insbesondere ein Probiotikum, beispielsweise ein Bifidobakterium.
- 5 19. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 17 oder 18, worin das funktionelle Additiv ein medizinischer Wirkstoff, insbesondere ein Heilmittel ist.
- 10 20. Verwendung von resisterter Stärke auf Basis wasserunlöslicher linearer  $\alpha$ -1,4-D-Glucane zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Vorbeugung von Magen-Darm-Erkrankungen.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No

PCT/EP 99/09298

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC 7	A23L1/09	C08L3/00	A61K9/20	A61K31/715
				A23K1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A23L C08L A61K A23K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 506 166 A (UNILEVER N.V.) 30 September 1992 (1992-09-30) page 2, line 5-9, 35-37	1, 2, 10-14
A	EP 0 688 872 A (CERESTAR HOLDING BV) 27 December 1995 (1995-12-27) cited in the application page 2, line 8-10	1
E	DE 198 30 618 A (AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO KG) 13 January 2000 (2000-01-13) cited in the application the whole document	14
A	WO 97 34932 A (BRITISH TECHNOLOGY GROUP LIMITED) 27 November 1997 (1997-11-27)	16
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report
29 March 2000	06/04/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Caturia Vicente, V

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No  
PCT/EP 99/09298

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 846 704 A (CERESTAR HOLDING B.V.) 10 June 1998 (1998-06-10) _____	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 04, 30 April 1996 (1996-04-30) & JP 07 313069 A (SAPPORO BREWERIES LTD), 5 December 1995 (1995-12-05) abstract _____	16, 18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/09298

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP 506166	A	30-09-1992	CA	2063784 A	26-09-1992
			JP	5236908 A	17-09-1993
EP 688872	A	27-12-1995	AT	177789 T	15-04-1999
			DE	69508307 D	22-04-1999
			DE	69508307 T	15-07-1999
			ES	2129756 T	16-06-1999
			FI	951794 A	16-10-1995
			GR	3030374 T	30-09-1999
			JP	8056690 A	05-03-1996
			NO	951460 A	16-10-1995
DE 19830618	A	13-01-2000	WO	0002926 A	20-01-2000
WO 9734932	A	25-09-1997	AU	2036997 A	10-10-1997
EP 846704	A	10-06-1998	AU	4684697 A	04-06-1998
			CA	2223149 A	03-06-1998
			JP	10191931 A	28-07-1998
JP 07313069	A	05-12-1995	CA	2148678 A	18-11-1995

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

L nationales Alterszeichen

PCT/EP 99/09298

A. KLASSEFIZIERTUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A23L1/09 C08L3/00 A61K9/20 A61K31/715 A23K1/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestpräzisierung (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A23L C08L A61K A23K

Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisierung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGEBEHNE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 506 166 A (UNILEVER N.V.) 30. September 1992 (1992-09-30) Seite 2, Zeile 5-9, 35-37	1, 2, 10-14
A	EP 0 688 872 A (CERESTAR HOLDING BV) 27. Dezember 1995 (1995-12-27) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Zeile 8-10	1
E	DE 198 30 618 A (AVENTIS RESEARCH & TECHNOLOGIES GMBH & CO KG) 13. Januar 2000 (2000-01-13) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	14
A	WO 97 34932 A (BRITISH TECHNOLOGY GROUP LIMITED) 27. November 1997 (1997-11-27)	16
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besondere Bedeutung anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die gezeigt ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"T" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipien oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Anmeldedatum des Internationalen Rechercheberichts

29. März 2000

06/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Caturia Vicente, V

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/09298

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEBEHNE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 846 704 A (CERESTAR HOLDING B.V.) 10. Juni 1998 (1998-06-10)	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 04, 30. April 1996 (1996-04-30) & JP 07 313069 A (SAPPORO BREWERIES LTD), 5. Dezember 1995 (1995-12-05) Zusammenfassung	16,18

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

.nationales Aktenzeichen

**PCT/EP 99/09298**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 506166	A	30-09-1992	CA JP	2063784 A 5236908 A	26-09-1992 17-09-1993
EP 688872	A	27-12-1995	AT DE DE ES FI GR JP NO	177789 T 69508307 D 69508307 T 2129756 T 951794 A 3030374 T 8056690 A 951460 A	15-04-1999 22-04-1999 15-07-1999 16-06-1999 16-10-1995 30-09-1999 05-03-1996 16-10-1995
DE 19830618	A	13-01-2000	WO	0002926 A	20-01-2000
WO 9734932	A	25-09-1997	AU	2036997 A	10-10-1997
EP 846704	A	10-06-1998	AU CA JP	4684697 A 2223149 A 10191931 A	04-06-1998 03-06-1998 28-07-1998
JP 07313069	A	05-12-1995	CA	2148678 A	18-11-1995